

*На правах рукописи*



**Чернецова Елена Сергеевна**

**РАЗВИТИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ, ОСНОВАННЫХ  
НА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДАРТ И ЕЁ СОЧЕТАНИИ С ДРУГИМИ  
МЕТОДАМИ, ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СОСТАВА И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
доктора химических наук

Казань – 2017

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации (РУДН)

**Научный консультант:**

доктор химических наук, профессор **Калабин Геннадий Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Зенкевич Игорь Георгиевич**

доктор химических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Институт химии СПбГУ, профессор кафедры органической химии

**Мильман Борис Львович**

доктор химических наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», заведующий лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии

**Писарев Дмитрий Иванович**

доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится 20 октября 2017 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.080.07 при ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68, Зал заседаний Ученого совета (А-330).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и на сайте [www.kstu.ru](http://www.kstu.ru).

Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим направлять по адресу: 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68, КНИТУ, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.080.07 и по e-mail: [gulia\\_nn@yahoo.com](mailto:gulia_nn@yahoo.com).

Автореферат разослан

июля 2017 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета

Нугуманова Гульнара Наиловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Неотъемлемой частью задачи по охране здоровья человека, приоритетной в политике большинства стран, является обеспечение надлежащего качества лекарственных средств (ЛС). Для него при разработке ЛС и на всех этапах их жизненного цикла требуется проведение химического анализа, в том числе для изучения состава и контроля сырья, определения подлинности, контроля производства, оценки качества полученного ЛС, изучения его стабильности, стандартизации лекарственных форм (ЛФ) и их контроля. Целью анализа при этом может быть как получение сведений о *единственном* компоненте, так и *многокомпонентный* анализ для выявления заданных или неизвестных компонентов в объекте. Есть потребность в разработке универсальных, экспрессных подходов в фармацевтическом анализе, обеспечивающих высокую скорость единичных анализов и их достаточную информативность.

Нежелательно высокие затраты времени при использовании многих аналитических методик в фармации обусловлены необходимостью проведения длительных манипуляций с образцами сравнения, часто включая их анализ отдельно от исследуемых образцов. Согласно Государственной фармакопее РФ (ГФ РФ), содержание действующего вещества (ДВ; иногда в литературе применяется также термин «активный фармацевтический ингредиент») в ЛС чаще всего определяют методом ВЭЖХ, титриметрией или другими аналитическими методами, требующими использования специальных условий для селективного определения конкретных аналитов и образцов сравнения. Более детальный анализ может включать определение примесей – например, летучих остаточных растворителей. Наиболее сложен и трудоемок поиск неизвестных компонентов при исследованиях состава таких сложных объектов, как, например, фармакогностические объекты растительного и животного происхождения или другие биопробы. Методы масс-спектрометрии (МС) очень привлекательны с точки зрения информативности, но одним из ограничений наиболее распространенного в фармацевтическом анализе метода ВЭЖХ-МС помимо его стоимости является длительность анализа, а также в ряде случаев и невысокая стабильность

результатов во времени, что важно, например, при оценке биоэквивалентности дженериковых препаратов.

Актуальна разработка новых подходов к анализу таких объектов, как фармацевтические субстанции, таблетки, капсулы, мази, суппозитории, природные ЛС и другие пробы биологического происхождения. Интерес представляет не только контроль заданных аналитов, но и идентификация неизвестных компонентов, а также рассмотрение сигналов соединений-маркеров в качестве «отпечатков пальцев» для классификации и исследования состава объектов.

Одним из новых способов ионизации для МС является «прямой анализ в режиме реального времени» (direct analysis in real time, DART, ДАРТ), появившийся в 2005 году и представляющий интерес для применения в фармацевтической химии и фармакогнозии. На наш взгляд, масс-спектрометрия ДАРТ является многообещающим методом для организации скрининга, для которого не будет требоваться полномасштабная валидация, с целью сокращения выборок лекарственных препаратов и субстанций перед их анализом другими методами.

**Степень разработанности темы исследования.** До наших исследований не было опубликовано ни одной работы по применению ДАРТ-МС в фармацевтической химии, фармакогнозии или в других областях наук в России. Из имеющихся публикаций зарубежных авторов было известно, что привлекательной особенностью ДАРТ является потенциальная возможность быстрого анализа без пробоподготовки. В связи с новизной метода его достоинства и ограничения на момент начала данного исследования были мало изучены, метод был недостаточно развит, а имеющихся отдельных публикаций о нем было недостаточно для обобщения и формирования выводов о возможностях применения данного метода для решения задач фармации. До начала нашего исследования практически все опубликованные данные были получены с использованием одной и той же модели масс-спектрометра. Отсутствовали достоверные данные о возможностях применения в фармацевтической химии и фармакогнозии сочетания ДАРТ с масс-анализатором на основе орбитальной ионной ловушки и с тонкослойной хроматографией (ТСХ), о достоинствах и ограничениях таких сочетаний, а также вариантах их реализации. Масс-спектры ДАРТ, по которым, как предполагалось, можно было бы проводить экспрессную идентификацию компонентов фармацевтических

субстанций, были приведены в литературе полностью только для нескольких наркотических субстанций и антималярийных препаратов. При этом проводили качественный анализ и не рассматривали возможность проводить следующую стадию скрининга для быстрого определения содержания ДВ в отсутствие образцов сравнения – в чем, с нашей точки зрения, автоматический элементный анализ (АЭА) может хорошо дополнить ДАРТ-МС. Большой практический интерес представляла разработка новых подходов для решения различных задач фармацевтического анализа, основанных на ДАРТ-МС – например, для определения подлинности ЛС и выявления фальсификатов, а также для получения новых данных о составе биопроб, в том числе природных ЛС.

**Цель работы:** развитие научных основ и создание системы новых подходов, основанных на ДАРТ-МС, для изучения состава и контроля качества ЛС.

**Задачи,** которые необходимо было решить для достижения поставленной цели:

- 1) обоснование путей повышения избирательности и чувствительности детектирования компонентов лекарственных средств методом ДАРТ-МС;
- 2) выявление критериев выбора условий для фармацевтического анализа методом ДАРТ-МС, изучение масс-спектров широкого круга соединений различных химических классов и параметров, влияющих на состав масс-спектров ДАРТ;
- 3) расширение возможностей ДАРТ-МС в обнаружении компонентов ЛС и разработка новых подходов, включающих анализ образцов с твердых подложек, позволяющих оптимизировать отбор, хранение и транспортировку (био)проб, а также *online*- и *offline*-сочетания ТСХ с ДАРТ-МС;
- 4) разработка быстрого и универсального способа определения содержания действующего вещества в лекарственных препаратах и субстанциях при использовании АЭА как метода быстрого фармацевтического анализа, комплементарного ДАРТ-МС;
- 5) разработка методологии для быстрого обнаружения фальсифицированных лекарственных средств, основанной на ДАРТ-МС и АЭА;

- б) разработка методологии фармацевтического анализа, основанной на ДАРТ-МС и ее сочетании с ТСХ, а также с другими методами анализа.

**Научная новизна работы.** На основании систематического исследования масс-спектров ДАРТ широкого круга используемых в фармацевтической практике соединений различных химических классов (алифатические и ароматические углеводороды, спирты, карбоновые кислоты, карбонилсодержащие соединения, аминокислоты, сахара, фенольные соединения, гетероциклические соединения) выявлены параметры, влияющие на избирательность и чувствительность, и обоснован выбор критериев оптимизации условий анализа.

Обоснованы выбор и условия использования ДАРТ-МС для регистрации характеристичных сигналов и идентификации отдельных компонентов фармацевтических объектов, а также целесообразность и способы использования других методов, дополняющих ДАРТ-МС при решении задач фармацевтического анализа.

Разработаны новые способы снижения пределов обнаружения в ДАРТ-МС и использования подложек из различных материалов для обеспечения отбора проб на месте контроля и транспортировки к анализатору (масс-спектрометру с ионизацией ДАРТ). Предложены способы визуализации ионизирующего потока, расширяющие возможности сканирования поверхностей объектов методом ДАРТ-МС. Разработанные способы анализа при сочетании ионизации ДАРТ и ТСХ обеспечивают одновременную регистрацию десятков соединений в идентичных условиях.

Установлена возможность быстрого обнаружения ДВ в ряде лекарственных препаратов отечественного и зарубежного производства (субстанции, капсулы, таблетки, суппозитории, мази, капли, эфирные масла) в отсутствие образцов сравнения методом ДАРТ-МС низкого и высокого разрешения.

Разработан быстрый и универсальный способ определения содержания ДВ в различных ЛС (субстанции, капсулы, таблетки, растворы в ампулах), основанный на АЭА и не требующий использования образцов сравнения аналитов, точность которого сопоставима с точностью общепринятых методов или превосходит ее.

С использованием разработанных подходов, основанных на ДАРТ-МС низкого и высокого разрешения и её сочетании с высокоэффективной ТСХ

(ВЭТСХ), впервые охарактеризован состав бадана (*Bergenia crassifolia* L.), прополиса и мёда. Показана возможность быстрого контроля качества проб благодаря одновременной регистрации десятков соединений, в отличие от общепринятых методов анализа.

Разработана методология для быстрого обнаружения фальсификатов и определения качества ЛС, основанная на ДАРТ-МС низкого и высокого разрешения и АЭА, а также методология быстрого контроля качества и изучения состава (природных) ЛС, основанная на ДАРТ-МС и ее сочетании с ТСХ.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные о составе масс-спектров ДАРТ и его зависимости от условий эксперимента для широкого круга соединений позволяют сделать выводы о возможностях и ограничениях ДАРТ-МС, выявить критерии выбора условий анализа объектов и обосновать новые области применения ДАРТ-МС в фармацевтической химии. Благодаря разработке новых способов визуализации ионизирующего потока из источника ДАРТ и основанных на них способов сканирования объектов предложены новые способы подачи пробы в ДАРТ-МС, в том числе для её сочетания с ТСХ. Создан первый прототип трехмерного сканера для ДАРТ, обеспечивающий размещение плоских объектов в области ионизации ДАРТ с адаптируемыми координатами. Предложенные способы анализа методом ДАРТ-МС обеспечивают повышение избирательности и чувствительности, а также возможность осуществления оперативного контроля качества анализируемых объектов благодаря новым подходам к отбору проб, их хранению и транспортировке к анализатору.

Систематизированы и расширены возможности ДАРТ-МС в решении различных задач фармацевтического анализа (контроль качества ЛС, исследование состава природных ЛС и вспомогательных веществ). За счет более простой пробоподготовки и возможности быстрого одновременного разделения до 20 проб в идентичных условиях производительность разработанного способа скрининга мёда на 5-гидроксиметилфурфурол в несколько раз выше производительности ВЭЖХ, что обеспечивает возможность более эффективного контроля качества. На основании анализа 91 образца прополиса, собранных в различных регионах, разработан новый подход к классификации образцов прополиса, основанный на

совместном использовании ДАРТ-МС и ВЭТСХ для обнаружения фенольных соединений. Получены новые данные о составе компонентов прополиса и бадана, имеющие значение для оценки качества и изучения их медицинских свойств. Разработанные подходы к классификации и идентификации ключевых компонентов сложных смесей применимы для быстрой оценки качества природных ЛС и получения информации об их компонентах, а также для быстрого установления происхождения (подлинности) образцов.

Разработанная методология скрининга, осуществляемого методами ДАРТ-МС и АЭА, обеспечивает быстрый контроль качества ЛС в отсутствие образцов сравнения ДВ. Разработанная методология анализа ЛС, основанная на ДАРТ-МС и ТСХ, обеспечивает возможность быстрого сопоставления объектов исследования по многомерным признакам и обнаружения веществ, определяющих качество ЛС. С использованием разработанных подходов возможно проведение предварительной идентификации и оценки чистоты фармацевтических субстанций, что позволит прогнозировать для вновь создаваемых ЛФ их безопасность и терапевтическую эффективность.

Значимость работы подтверждена показателями цитирования основных публикаций по теме исследования. Согласно данным Научной электронной библиотеки eLibrary.ru, из них 17 статей процитированы более 5 раз. Максимальное число цитирований для публикации по результатам эксперимента – 29, для обзорной статьи – 67 (по состоянию на 17 апреля 2017 г.).

**Методология и методы исследования.** Наряду с ДАРТ-МС низкого и высокого разрешения в исследованиях, вошедших в данную работу, использовали следующие современные методы физико-химического анализа: ВЭТСХ, ВЭТСХ-МС с ионизацией электрораспылением (ИЭР), ГХ-МС, спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР), АЭА. Для оценки достоверности количественных результатов и их сравнения с результатами, получаемыми с использованием традиционных подходов, в работе использовали предоставленные независимыми организациями данные анализа объектов исследования следующими методами: ВЭЖХ, спектрофотометрия, титриметрия, потенциометрия. Для статистической обработки результатов были использованы современные программные средства «Excel» и «MATLAB». Для информационного поиска использовали анализ

литературных данных и поисковую систему для научного библиографического поиска «SciFinder».

**Внедрение в практику.** Результаты публикаций по теме работы частично использованы при создании общих фармакопейных статей (ОФС) «Автоматический элементный анализ» и «Масс-спектрометрия», вошедших в ГФ РФ XIII.

Методологические основы и подходы к анализу ЛС и фармакогностических объектов, разработанные в ходе данной диссертационной работы, внедрены в деятельность Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра) Российского университета дружбы народов (ЦКП (НОЦ) РУДН), ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», ООО «Экзакте Лабс», ООО «ИМИД» и ЗАО «Биокад». Материалы работы внедрены в учебный процесс Российского университета дружбы народов при проведении обучающих курсов ЦКП (НОЦ) РУДН и при разработке в рамках государственного контракта № 05.P14.12.0018 от 05.10.2015 г. магистерской программы по инструментальным методам фармакопейного анализа. Также они внедрены в деятельность кафедры фармацевтической химии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России) и в деятельность ежегодного обучающего семинара Всероссийского масс-спектрометрического общества «Практические аспекты применения методов газовой хроматографии/масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии». Результаты внедрения подтверждены соответствующими актами.

**На защиту выносятся:**

- Результаты изучения состава масс-спектров и обоснование выбора критериев для оптимизации условий анализа методом ДАРТ-МС.
- Способы увеличения воспроизводимости масс-спектров ДАРТ благодаря визуализации ионизирующего потока из источника ДАРТ на поверхности объекта исследования.

- Подходы в ДАРТ-МС, обеспечивающие снижение пределов обнаружения и оперативный контроль качества анализируемых объектов благодаря отбору проб на месте контроля и транспортировке к анализатору.
- Новые способы анализа, основанные на сочетании ДАРТ-МС с ТСХ, включая разработанные способы сканирования поверхностей образцов.
- Способы быстрого анализа органических субстанций и ЛС, позволяющие проводить обнаружение ДВ в отсутствие образцов сравнения, основанные на ДАРТ-МС низкого и высокого разрешения.
- Способы быстрого определения содержания ДВ в различных лекарственных препаратах (субстанции, капсулы, таблетки, растворы в ампулах), не требующие использования образцов сравнения аналитов.
- Новые сведения о составе прополиса и бадана толстолистного, полученные с использованием разработанных новых подходов.
- Способ скрининга биологически активного вещества (5-гидроксиметилфурфурол) в сложной матрице природного происхождения (мед), превосходящий общепринятые методы по экспрессности.
- Методология экспрессного определения качества лекарственных препаратов и субстанций, основанная на ДАРТ-МС низкого и высокого разрешения и АЭА.
- Методология быстрого контроля качества и изучения состава ЛС, основанная на ДАРТ-МС и ее сочетании с ТСХ или некоторыми другими методами (ГХ-МС, ЯМР), не требующими образцов сравнения ДВ.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне в объеме, достаточном для приведенных в работе обобщений и обоснования выводов. В ходе её выполнения использованы современные методы исследования. Экспериментальные данные, полученные автором, достоверны, обработаны с помощью современного программного обеспечения к аналитическим приборам (IonSense «DART Control», Agilent «Chemstation», Thermo Fisher Scientific «XCalibur», CAMAG «WinCats») с применением методов современной статистики. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, аргументированы, достоверны и логически вытекают из полученных автором экспериментальных

данных и их анализа, а также сопоставления с литературными данными. Первичная документация исследования проверена и полностью соответствует материалам, содержащимся в работе. В диссертации использован и проанализирован достаточный объем литературных данных о работах отечественных и иностранных авторов, имеющих отношение к теме исследования.

Результаты работы были представлены на следующих российских и международных научных форумах:

1-й Конференции по фармацевтическим наукам «ВВВВ» (Венгрия, 2005); Международном конгрессе «ICAS-2006» (Москва); Всероссийском научно-практическом семинаре «Методы и приборное обеспечение для агропромышленного комплекса и пищевой промышленности» (Москва, 2009); III Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2009» (Санкт-Петербург); II Международном симпозиуме по сорбции и экстракции с заочным участием (Владивосток, 2009); 11-й Международной конференции «ISMAS» (Хайдерабад, Индия, 2009); III, IV и V Всероссийской конференции «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, 2009, 2011 и 2013); 11-м Международном симпозиуме «НТС-11» (Бельгия, 2010); Съезде аналитиков России «Аналитическая химия - новые методы и возможности» (Москва, 2010); 4-й Всероссийской конференции «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» (Звенигород, 2010); Международной научной конференции по аналитической химии и экологии (Казахстан, 2010); 28-м Международном симпозиуме по хроматографии (Испания, 2010); Съезде Британского сообщества по МС (Великобритания, 2010); 1-й Международной академической конференции молодых ученых «Chemistry and Chemical Technology 2010» (Украина); Съезде немецкого сообщества специалистов по пищевой химии (Германия, 2011); Съезде пищевых химиков Германии «Deutscher Lebensmittelchemikertag» (Халле, Германия, 2011); Съезде немецкого сообщества «Lebensmittelchemische Gesellschaft, Nord & Süd-West. Arbeitstagung 2011» (Германия, 2011); Конференции «ANAKON 2011» (Швейцария); 13-м симпозиуме молодых химиков Немецкого химического сообщества (Германия, 2011); 36-м Международном симпозиуме «HPLC 2011» (Венгрия); 9-й Международной конференции «PETROMASS 2011» (Москва); 5-м Международном симпозиуме

«RAFA-2011» (Чехия); 2-м научном семинаре FCUB-ERA «Food chemistry and biotechnology» (Сербия, 2011); Европейской конференции «EuroAnalysis XVI» (Сербия, 2011); Международном симпозиуме по ВЭТСХ (Швейцария, 2011); XXXIV симпозиуме «Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds» (Польша, 2011); Европейской зимней конференции по спектроскопии плазмы (Испания, 2011); 8-м зимнем симпозиуме по хемометрике (Дракино, 2012); Российско-Немецком коллоквиуме общества Гумбольдта (Москва, 2012); Международной конференции «NVMS – BSMS» (Нидерланды, 2012); XVI Международном конгрессе «PHOTORHARM 2012» (Санкт-Петербург); Совместной конференции немецкого и польского МС-сообществ (Польша, 2012); 9-й Всероссийской конференции «Химия фтора» (Москва, 2012); 13-й Европейской конференции по химии объектов окружающей среды (Москва, 2012); 6-м Международном симпозиуме «RAFA-2013» (Чехия); 2-м Съезде аналитиков России (Москва, 2013); 10-й Международной конференции «PETROMASS 2014» (Грузия); Международной конференции по анализу малых молекул методом ЯМР-спектроскопии (США, 2014); XIX Международном конгрессе «PHOTORHARM 2015» (Германия) и 2-й Международной конференции «Инновации в масс-спектрометрии: приборы и методы» (Москва, 2016).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.**

Исследование соответствует формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» и пунктам 3 и 6 паспорта научной специальности.

**Личный вклад автора.** Автором самостоятельно осуществлен выбор научного направления. Наибольшая часть исследований и 95% экспериментов по регистрации масс-спектров ДАРТ выполнены лично автором диссертационной работы. Во всех работах автору принадлежит ведущая роль в постановке цели и задач, выборе объектов исследования, планировании и проведении экспериментов, интерпретации и обобщении данных. В 26 из 33 основных публикаций по теме диссертации автор ответственен за корреспонденцию, связанную с этими статьями.

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 33 публикации в журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций, и 59 тезисов докладов.

**Работа выполнена** в рамках программы стратегического развития РУДН на 2012-2016 гг., а также при финансовой поддержке программы международного обмена между Россией и странами Европейского Союза «Erasmus Mundus Action 2 – Partnerships // Project IAMONET-RU (Lot 5)» в 2011-2012 годах, германско-российского междисциплинарного научного центра (проект №С-2011b-x1, 2011 г.), Совета по грантам Президента Российской Федерации (грант МК-594.2010.3, 2010-2011 гг.), совместной российско-немецкой программы «Михаил Ломоносов» между Аналитической ведомственной целевой программой «Развитие научного потенциала высшей школы» и Германской службой академических обменов (проекты №2.2.2.3/9055, 2010-2011 гг. и №15112, 2011 г.) и международного научно-технического центра (проект №2829, 2004-2006 гг.).

Автор выражает искреннюю признательность доктору фармацевтических наук, профессору Шикову А.Н. (ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», Ленинградская область, п. Кузьмолровский, Россия) за консультирование и многочисленные полезные советы по работе с точки зрения специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», а также за предоставление образцов листьев бадана, совместные исследования состава этих листьев и обеспечение проведения их анализа методом ГХ-МС; доктору химических наук, профессору Ревельскому И.А. (кафедра аналитической химии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия) за многолетнее плодотворное сотрудничество и совместные исследования в области применения АЭА для скрининга ЛС на фальсификаты; директору подразделения токсикологической химии Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов Д. Сатцгеру (Food and Drug Administration, США) за предоставление образцов ряда лекарственных средств и данных их анализа независимыми фармакопейными методами; профессору Г.Е. Морлок (отдел наук о питании Университета имени Ю. Либиха, Гиссен, Германия) за консультации и совместные исследования в области ТСХ и ее сочетания с ДАРТ-МС, проведенные в рамках программ международного обмена между Россией и Германией в Университете Хоэнхайм (Штутгарт, Германия); специалистам фирмы-производителя оборудования для ДАРТ Муссельману Б. и Кроуфорд Е. (компания «IonSense», США) за совместные исследования по разработке трехмерного сканера

для ДАРТ и доктору Ристивоевичу П. (центр инноваций Химического факультета Университета г. Белград, Сербия) за проведение обработки масс-спектров ДАРТ и ТСХ-хроматограмм средствами хемометрики в программе «MATLAB».

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 367 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, трех глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 39 таблицами и 79 рисунками. Список цитируемой литературы включает 510 источника, из которых 439 на иностранных языках.

**Во введении** обоснована актуальность темы; сформулированы цель, задачи исследования; указаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология, положения, выносимые на защиту; приведены сведения о докладах и публикациях по диссертации; отражен личный вклад автора. **В первой главе** (обзор литературы) рассмотрены особенности и перспективы ДАРТ-МС с точки зрения ее применения в фармацевтической химии и фармакогнозии; обобщены литературные данные о составе масс-спектров ДАРТ; приведены сведения о применениях ДАРТ-МС в анализе ЛС, биоматериалов и других объектов. **Вторая глава** посвящена описанию и характеристике объектов и методов исследования. В экспериментах использованы модельные органические соединения, фармацевтические субстанции, синтетические ЛС и фармакогностические объекты растительного и животного происхождения. Для их анализа использованы современные методы исследования. **Третья глава** посвящена оценке и развитию ДАРТ-МС для фармацевтического анализа, приведены результаты изучения закономерности влияния различных условий на состав масс-спектров ДАРТ, обсуждается развитие способов подготовки и ввода проб для ДАРТ-МС, которые могут быть полезны в решении задач фармацевтической химии и фармакогнозии. **В четвертой главе** отражены результаты развития системы подходов, основанных на ДАРТ-МС, для контроля качества синтетических лекарственных препаратов и субстанций и их скрининга на фальсификаты, и описаны результаты анализа ряда лекарственных препаратов российского и зарубежного изготовления с использованием разработанных подходов. Для ряда твердых и жидких ЛФ показана возможность использования АЭА или ЯМР для оценки содержания ДВ. **Пятая**

**глава** содержит результаты анализа природных ЛС, проведенного с использованием новых подходов к анализу таких объектов, основанных на ДАРТ-МС и ее сочетании с другими методами (ТСХ, ГХ-МС). Обсуждаются результаты изучения состава фармакогностических объектов животного и растительного происхождения: продуктов пчеловодства (прополис, мёд) и листьев бадана. В **приложении** приведены ОФС «Автоматический элементный анализ» и фрагмент ОФС «Масс-спектрометрия», копии актов внедрения, а также масс-спектры ДАРТ твердых ЛФ, не вошедшие в основной текст диссертации.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе исследовали ряд модельных объектов, представляющих собой лекарственные препараты или фармакогностические объекты, а также более 50 индивидуальных модельных соединений, используемых в фармацевтическом анализе. Для регистрации масс-спектров ДАРТ использовали времяпролетный масс-спектрометр «AccuTOF» (JEOL, Япония), квадрупольный масс-спектрометр модели «G1956B» (Agilent, Германия) и два масс-спектрометра с масс-анализатором «орбитальная ионная ловушка» серии «Exactive», временный доступ к которым был предоставлен специалистом компании «Thermo Fisher Scientific» (Бремен, Германия) Бромирски М. Также использовали оборудование для ТСХ (САМАГ, Швейцария), для АЭА (Thermo Fisher Scientific и Gerhardt, Германия), спектрометр ЯМР (JEOL), системы ГХ-МС (Thermo Fisher Scientific и JEOL) и ВЭЖХ-МС (Agilent). Для сбора и обработки данных использовали соответствующее специальное программное обеспечение.

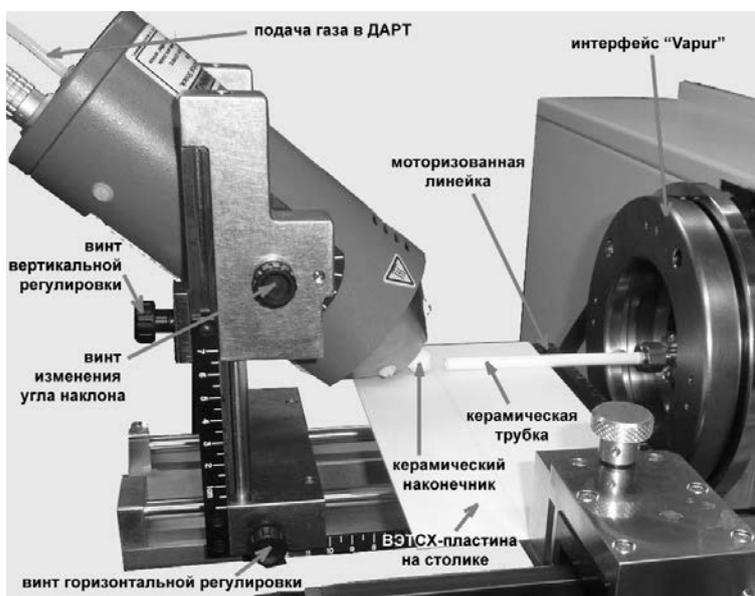
### **ОЦЕНКА И РАЗВИТИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДАРТ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

Представляло интерес совершенствование подходов для обеспечения более эффективного использования возможностей ДАРТ-МС в фармацевтической химии и фармакогнозии. Проведено систематическое исследование масс-спектров ДАРТ соединений различных химических классов, включая вещества с потенциальной или

установленной биологической активностью, при сочетании ДАРТ с масс-анализатором посредством керамической трубки и вакуумного интерфейса. Установили, что составом масс-спектров ДАРТ можно частично управлять, и выявили зависимости состава масс-спектров ДАРТ от следующих параметров объектов и эксперимента: состав матрицы образца, состав окружающей атмосферы, температура, состав и скорость потока газа-носителя, размеры керамической трубки, давление в вакуумном интерфейсе, напряжение на входе в масс-анализатор. Для полиэтиленгликоля (ПЭГ) – одного из наиболее изученных ранее методом ДАРТ-МС соединения – установили, что состав масс-спектров сильно зависит от условий анализа и изменяется в течение нескольких секунд ввода образца, так как термодесорбция компонентов происходит в разное время, в зависимости от летучести и молекулярной массы этих компонентов. Идентифицировали ионы состава  $[M+NH_4]^+$ , возможность присутствия в масс-спектрах ПЭГ которых не была отражена в литературе на момент исследования. При обобщении результатов, полученных при исследованиях разных аналитов в различных матрицах и в различных условиях, установлены закономерности образования масс-спектров, которые следует принимать во внимание при выборе условий анализа. Главным критерием оптимизации условий эксперимента в большинстве случаев может являться *увеличение относительной интенсивности протонированных или депротонированных молекул при снижении относительной интенсивности всех остальных ионов компонента*, достигаемое за счет использования выявленных закономерностей в ионизации различных химических классов соединений и соответствующего изменения условий эксперимента. Выбраны обобщенные оптимальные стартовые условия экспериментов для применений ДАРТ-МС в фармацевтическом анализе.

До 2010 года во всех источниках ДАРТ использовали соосную подачу газа по отношению ко входу в масс-анализатор и к объекту анализа. В 2010 году появилась модель источника ДАРТ с изменяемым углом наклона, но методология, необходимая для использования такой модели при сканировании поверхностей, особенно ТСХ-пластин, до данного исследования в литературе отсутствовала. Для сканирования поверхностей требовалось разработать универсальные способы определения области ионизирующего потока из источника ДАРТ на поверхности

объекта исследований, обеспечивающие оптимальную чувствительность анализа в каждом индивидуальном случае. Для этого разработали способы увеличения воспроизводимости масс-спектров ДАРТ благодаря визуальному определению области ионизирующего потока на анализируемой поверхности. Впервые введено понятие «визуализации» в ДАРТ-МС. По нашему специальному заказу производителем оборудования для ДАРТ изготовлен и затем введен в производство первый прототип трехмерного сканера для ДАРТ (рис. 1), обеспечивающий размещение плоских объектов в области ионизации ДАРТ с адаптируемыми координатами.



**Рис. 1.** Первый прототип трехмерного сканера для ДАРТ (© Wiley: E.S. Chernetsova, G.E. Morlock. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 1242–1252)

Разработан способ сканирования, обеспечивший более высокие воспроизводимость состава масс-спектров вдоль скана и достоверность идентификации веществ на основании этих спектров. Рассмотрены возможности и ограничения различных способов сочетания ДАРТ-МС с ТСХ, впервые введено понятие «планарная хроматомасс-спектрометрия» и разработан ряд подходов для осуществления анализа методом ДАРТ-МС, обеспечивающих снижение пределов обнаружения по концентрации и оперативный контроль за счет отбора проб на месте контроля и транспортировки к анализатору.

## **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И СУБСТАНЦИЙ, ОСНОВАННЫЙ НА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДАРТ**

### **Быстрый скрининг для идентификации компонентов лекарственных средств методом масс-спектрометрии ДАРТ**

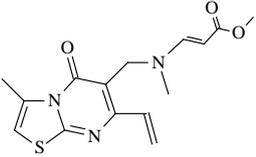
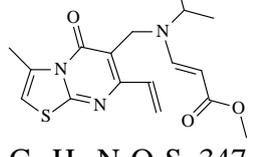
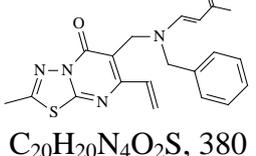
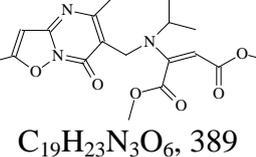
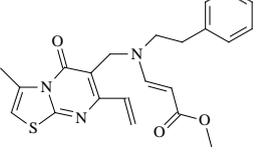
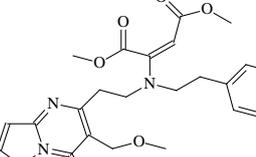
#### **Идентификация компонентов азотсодержащих органических субстанций.**

Проводили идентификацию азотсодержащих гетероциклических соединений – продуктов органического синтеза, производных пиримидина с различными функциональными группами (соединения с потенциальной цитотоксичностью) – методом ДАРТ-МС с использованием оптимизированных условий. Для всех субстанций наблюдали интенсивные сигналы  $[M+H]^+$ . При использовании режима высокого разрешения времяпролетного масс-анализатора подтверждали соответствие состава аналитов ожидаемому за счет точных значений  $m/z$  и расчета возможного элементного состава соответствующих ионов (табл. 1). Шкалу масс калибровали с использованием ПЭГ с учетом предварительно полученных данных о его масс-спектрах.

Данный подход быстрее и проще общепринятых способов идентификации компонентов фармацевтических субстанций, так как не требует больших временных затрат и может быть использован для анализа субстанций, содержащих примеси. При наличии в веществе побочных продуктов синтеза или исходных реагентов их элементный состав можно установить тем же способом, что и для основного продукта. Предложенный подход применим, в том числе, для отслеживания хода реакций синтеза фармацевтических субстанций путем отбора проб в процессе синтеза и их немедленного ДАРТ-МС анализа. Аналогичный способ анализа применим к капсулированным лекарственным препаратам путем раскрытия капсулы и анализа содержащейся в ней субстанции с помощью описанного выше подхода.

Таблица 1

Подтверждение результатов органического синтеза по масс-спектрам ДАРТ субстанций ( $n = 4$ ,  $P = 0.95$ ) (© Чернецова Е.С., Овчаров М.В., Хомяков Ю.Ю., Бочков П.О., Варламов А.В. Изв. Акад. наук. Сер. хим. 2010. Т. 57, № 10. С. 1963 – 1964)

№	Структурная и брутто-формула продукта синтеза, моноизотопная молекулярная масса	$m/z_{\text{эксп.}}$	$s_{\text{г}}, \%$	Элементный состав	$m/z_{\text{теор.}}$
1	 $C_{15}H_{17}N_3O_3S$ , 319	320.107±0.001	0.0002	$C_{15}H_{18}N_3O_3S$	320.107
2	 $C_{17}H_{21}N_3O_3S$ , 347	348.141±0.001	0.0002	$C_{17}H_{22}N_3O_3S$	348.138
3	 $C_{20}H_{20}N_4O_2S$ , 380	381.139±0.001	0.0002	$C_{20}H_{21}N_4O_2S$	381.139
4	 $C_{19}H_{23}N_3O_6$ , 389	390.167±0.001	0.0002	$C_{19}H_{24}N_3O_6$	390.167
5	 $C_{22}H_{23}N_3O_3S$ , 409	410.157±0.004	0.0006	$C_{22}H_{25}N_3O_3S$	410.154
6	 $C_{25}H_{29}N_3O_7$ , 483	484.208±0.003	0.0004	$C_{25}H_{30}N_3O_7$	484.208

**Идентификация компонентов твердых лекарственных форм (таблетки, капсулы).** Изучали масс-спектры для выборки широко используемых в медицине твердых ЛФ, ранее не исследованных этим методом: препаратов «Анаприлин», «Аспаркам», «Аспирин», «Бисептол», «Глицин», «Диакарб», «Ибупрофен»,

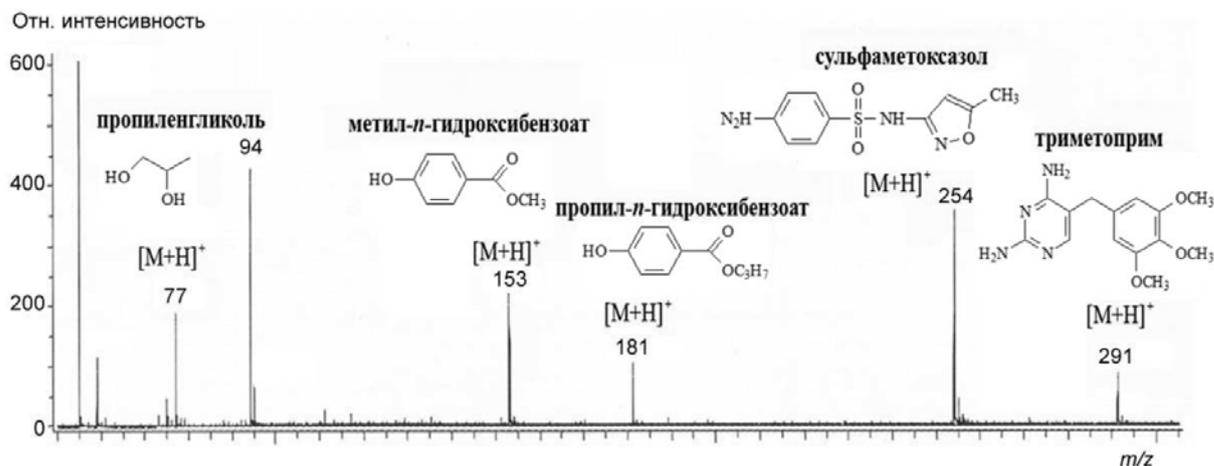
«Мексидол», «Ноотропил», «Пантогам», «Фурацилин», «Эреспал» и «Эрсефурил». В масс-спектрах наблюдали сигналы характеристичных ионов их компонентов – протонированных молекул и некоторых других ионов (табл. 2).

Таблица 2

Характеристичные сигналы компонентов изученных ЛС в масс-спектрах ДАРТ  
(© Чернецова Е.С., Бочков П.О., Овчаров М.В., Затонский Г.В., Абрамович Р.А.  
Масс-спектрометрия. 2010. Т. 7, № 2. С. 147 – 149; © Чернецова Е.С., Бочков П.О.,  
Затонский Г.В., Абрамович Р.А. Хим.-фарм. журнал. 2011. Т. 45, № 5. С. 50 – 52)

Название препарата	Низкомолекулярные компоненты	$m/z$ наблюдаемых ионов	Интерпретация состава ионов
«Анаприлин»	Пропранолол, 10 мг	260	$[M+H]^+$
«Аспаркам»	Аспарагиновая кислота, 300 мг (в форме солей)	134	$[M+H]^+$
«Аспирин»	Ацетилсалициловая кислота, 100 мг	121, 163, 181	$[M-OCOCH_3+H]^+$ , $[M-18+H]^+$ , $[M+H]^+$
«Бисептол»	<i>Действующие вещества:</i> сульфаметоксазол, 100 мг триметоприм, 20 мг <i>Вспомогательные вещества:</i> пропиленгликоль метил- <i>n</i> -гидроксибензоат пропил- <i>n</i> -гидроксибензоат	254	$[M+H]^+$
		291	$[M+H]^+$
		77, 94	$[M+H]^+$ , $[M+18]^+$
		153	$[M+H]^+$
181	$[M+H]^+$		
«Глицин»	Глицин, 100 мг	76, 151	$[M+H]^+$ , $[2M+H]^+$
«Диакарб»	Ацетазоламид, 250 мг	223	$[M+H]^+$
«Ибупрофен»	Ибупрофен, 200 мг	207, 224, 413	$[M+H]^+$ , $[M+18]^+$ , $[2M+H]^+$
«Мексидол»	Этилметилгидроксипиридина сукцинат, 125 мг	138, 275	$[M+H]^+$ , $[2M+H]^+$
«Ноотропил»	Пирацетам, 800 мг	143, 285	$[M+H]^+$ , $[2M+H]^+$
«Пантогам»	Гопантенная кислота, 250 мг	216, 234	$[M-18+H]^+$ , $[M+H]^+$
«Фурацилин»	Нитрофурал, 20 мг	199, 397	$[M+H]^+$ , $[2M+H]^+$
«Эреспал»	Фенспирид, 80 мг	261	$[M+H]^+$
«Эрсефурил» капсулы	Нифуроксазид, 200 мг	276	$[M+H]^+$

Помимо действующих веществ, таким способом можно идентифицировать и другие низкомолекулярные компоненты ЛС, что видно на примере масс-спектра таблетки «Бисептол» (рис. 2). Благодаря особенностям ионизации ДАРТ высокомолекулярные и неорганические компоненты матрицы не ионизировались, а масс-спектры были просты и удобны для интерпретации.



**Рис. 2.** Масс-спектр ДАРТ лекарственного препарата «Бисептол»  
 (© Чернецова Е.С., Бочков П.О., Овчаров М.В., Затонский Г.В., Абрамович Р.А.  
*Масс-спектрометрия. 2010. Т. 7, № 2. С. 147 – 149*)

Предложенный подход позволяет отбраковать из исходной выборки образцы, не содержащие заданного ДВ, но не дает ответа о количестве ДВ в этих образцах и не исключает путь к фальсификации ЛС, при котором в таблетку добавлялось бы вместо заданного ДВ вещество-имитатор с такой же целочисленной молекулярной массой или даже брутто-формулой. Поэтому этот подход следует рассматривать в качестве скринингового, цель которого – сокращение числа проб ЛС, которые впоследствии предполагается анализировать другими методами.

**Идентификация компонентов других лекарственных форм (мази, суппозитории, капли).** Обнаружение аналитов в масс-спектрах ДАРТ ЛС, в состав матрицы которых входит много низкомолекулярных органических компонентов, осуществлять сложнее. Анализировали мази «Тетрациклин», «Синтомицин», «Левомеколь», «Оксолин», капли «Корвалол» и суппозитории на основе твердого жира. Для большинства ДВ изученных препаратов в масс-спектрах наблюдали интенсивные сигналы  $[M+H]^+$ , по которым подтверждали наличие ДВ в соответствующих препаратах. Использование высокого разрешения обеспечивало более высокую достоверность идентификации. В масс-спектрах ДАРТ мазей «Синтомицин» двух производителей сигналы протонированной молекулы хлорамфеникола представлены характеристичным триплетом с  $m/z$  323, 325, 327. Сложный состав сигнала протонированной молекулы хлорамфеникола в масс-спектрах ДАРТ объясняется присутствием в ней двух атомов хлора. Подобные характеристичные сигналы могут

использоваться в качестве «отпечатков пальцев» хлорсодержащих соединений для их распознавания в масс-спектрах ДАРТ. Кроме сигнала хлорамфеникола в масс-спектрах ДАРТ мазей «Синтомицин» обоих производителей зарегистрированы интенсивные сигналы со значениями  $m/z$  113 и 225. Эти сигналы соответствовали протонированной молекуле сорбиновой кислоты и ее иону-димеру  $[2M+H]^+$ .

При использовании высокого разрешения возможна калибровка шкалы масс по сигналам основы ЛС, что обеспечивает более высокую экспрессность анализа таких препаратов. Предлагаемый подход, основанный на обнаружении ДВ методом ДАРТ-МС, может быть использован для быстрого скрининга на фальсификаты ЛФ со сложным составом низкомолекулярных компонентов основы.

### **Быстрая оценка содержания действующего вещества в лекарственных средствах в отсутствие образцов сравнения**

Быстрое определение содержания ДВ актуально при контроле качества фармацевтических субстанций и для быстрого обнаружения фальсифицированных ЛС. Общепринятые методы контроля чаще всего не позволяют быстро определять ДВ в связи с большими затратами времени на пробоподготовку, градуировку и непосредственное проведение анализа и требуют наличия образцов сравнения каждого вещества. Жидкостная хроматография (в том числе в ее ультраэффективном варианте) в большинстве случаев требует стандартов аналитов, а при определении содержания компонентов в отсутствие их стандартов путем внутренней нормализации площадей сигналов спектрофотометрического детектора возрастает вероятность погрешности за счет регистрации сигналов соэлюируемых с аналитами соединений. Криометрия – очень точный метод определения чистоты органических соединений – применима в общем случае только к фармацевтическим субстанциям, но не к ЛС сложного состава. Достоинствами метода спектроскопии в ближней инфракрасной области являются минимальная пробоподготовка, малая длительность одного анализа и возможность использования в полевых условиях. Однако для этого метода даже спектрометры, выпускаемые одним и тем же производителем, не обеспечивают регистрацию одинаковых спектров, а спектры весьма сложны по составу и виду, состоят из большого числа полос и зависят от изменения свойств субстанции, в том числе в ходе ее естественного старения в течение срока годности ЛС.

Как следовало из наших исследований, достоинством ДАРТ-МС является возможность быстрой идентификации компонентов ЛС по их масс-спектрам. Однако возможности ДАРТ-МС в количественном анализе в отсутствие внутреннего стандарта ограничены воспроизводимостью условий ионизации, поэтому решение задач быстрого количественного анализа ЛС представляется целесообразным с использованием других быстрых методов. Для расширения методологии анализа ЛС, основанной на ДАРТ-МС, представлялась перспективной разработка способов оценки содержания компонентов, при которых пробоподготовка была бы минимальной или отсутствовала, и которые, как и ДАРТ-МС, не требовали бы образцов сравнения определяемых аналитов.

**Оценка содержания действующего вещества в лекарственных средствах с использованием автоматического элементного анализа.** Для быстрой оценки содержания ДВ в лекарственных препаратах и субстанциях в качестве второй стадии скрининга представляло интерес рассмотреть возможность использования АЭА. Около 75% известных фармацевтических субстанций содержат в молекуле азот. Мы разработали вошедшие в 2015 г. в ГФ РФ XIII способы определения содержания азота в лекарственных препаратах и субстанциях, позволившие оценивать степень чистоты субстанций и количество ДВ в ЛС на основе полученных данных АЭА о содержании азота в них.

*Определение степени чистоты азотсодержащих субстанций.* Для контроля качества фармацевтических субстанций, а также чистоты других органических веществ, содержащих азот, нами разработан способ определения степени чистоты таких веществ методом АЭА. Для субстанций время анализа составляет ~7 минут. Установили: наименьшая погрешность обеспечивается, когда массы азота, полученные после конверсии навесок фармацевтической субстанции и азотсодержащего вещества-стандарта, близки друг к другу и составляют не менее 0.2 мг. Для обеспечения требуемой точности анализа градуировку с использованием вещества-стандарта строили в узком диапазоне (0.2–0.3 мг). По этой причине в дальнейших исследованиях выбранной навеске фармацевтической субстанции или лекарственного препарата всегда подбирали такие массы вещества-стандарта, чтобы количества азота, полученные после конверсии навески аналита,

были в узких пределах градуировочного графика. С использованием найденного методом АЭА содержания азота рассчитывали содержание ДВ в фармацевтических субстанциях (табл. 3) и таким образом определяли их степень чистоты.

Таблица 3

Результаты определения содержания действующего вещества в фармацевтических субстанциях с использованием АЭА ( $n = 7$ ,  $P = 0.95$ )  
(© Ревельский И.А., Чернецова Е.С., Лузянин Б.П., Глазков И.Н., Шнайдер А.А. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73. № 7. С. 20 – 26)

Субстанция	Чистота субстанции, %		
	специфицируемая (метод анализа)	найденная АЭА	
		$\langle x \rangle \pm \Delta x$	$s_r, \%$
Гидрохлоротиазид: партия № 1	100.2 (ВЭЖХ)	101.1 ± 0.4	0.4
	100.0 (ВЭЖХ)	101.1 ± 0.5	0.6
Каптоприл: партия № 1	99.1 (титриметрия)	99.1 ± 0.3	0.3
	99.23 (ВЭЖХ) 98.64 (титриметрия)	100.2 ± 0.6	0.6
Метоклопрамида гидрохлорид	99.6 (титриметрия)	99.2 ± 0.6	0.6
Соталола гидрохлорид: партия № 1	99.5 (потенциометрия) 99.7 (ВЭЖХ) 100.3 (титриметрия)	99.9 ± 0.5	0.5
	99.9 (ВЭЖХ) 103.1 (титриметрия)	99.6 ± 0.5	0.5
Ставудин: партия № 1	99.3 (ВЭЖХ)	99.9 ± 0.3	0.3
	103.21 (ВЭЖХ)	100.3 ± 0.4	0.4
Триамтерен	100.3 (титриметрия)	100.0 ± 0.3	0.3
Фозиноприл: партия № 1	98.9, 99 (ВЭЖХ)	99.4 ± 0.4	0.4
	98.4 (ВЭЖХ)	99.9 ± 0.4	0.4

Сопоставление данных, полученных традиционными методами анализа фармацевтических субстанций, и данных, полученных АЭА, позволяет сделать заключение о возможности определения чистоты субстанций методом АЭА. Данные ВЭЖХ, титриметрии и потенциометрии предоставлены Food and Drug Administration (FDA, США) в рамках выполнения совместного проекта. В результате разработан новый способ быстрого прямого определения степени чистоты фармацевтических субстанций и любых твердых органических веществ, содержащих в молекуле азот,

основанный на определении содержания азота методом АЭА. Этот способ универсален, пригоден для веществ различного строения, не требует пробоподготовки и градуировки по ДВ и образцов сравнения ДВ. В следующих разделах описано расширение такого подхода к контролю чистоты субстанций для случаев анализа твердых (капсулированных, таблетированных) и жидких (ампулированных) лекарственных форм.

*Определение содержания действующего вещества в твердых лекарственных формах.* Содержание ДВ в ЛС, как правило, определяют методами ВЭЖХ, титриметрии, потенциометрии или другими методами, требующими использования специальных условий для селективного определения. В таких случаях необходимы образцы сравнения каждого аналита для построения отдельной градуировочной зависимости. Метод спектроскопии в ближней инфракрасной области также обладает рядом ограничений, поэтому поиск альтернативных ИК-спектроскопии и доступных методов анализа, не требующих использования дорогостоящих образцов сравнения для определения подлинности фармацевтических субстанций и ЛС – по-прежнему актуальная задача фармации.

При использовании разработанного подхода проводили анализ твердых лекарственных форм (таблеток и капсул) на содержание ДВ. Экспериментальные данные сопоставляли с результатами, полученными при использовании ВЭЖХ (табл. 4, данные предоставлены FDA). Как и при исследовании фармацевтических субстанций, для обеспечения наиболее высокой точности определения содержания азота в твердых лекарственных препаратах требовалось, чтобы массы азота, полученные после конверсии соответствующих навесок препарата и вещества-стандарта, были близки между собой.

Таким образом, разработан новый подход к определению содержания ДВ в твердых ЛФ, основанный на АЭА. Он позволяет осуществлять быстрый скрининг на фальсификаты, не содержащие надлежащее количество ДВ, что открывает новые возможности в производственном контроле, внеплановом контроле качества фармацевтической продукции и скрининге для обнаружения фальсификатов.

Таблица 4

Сопоставление результатов определения содержания действующего вещества (ДВ) в твердых ЛС с использованием АЭА и общепринятого метода ВЭЖХ ( $n = 7, P = 0.95$ )  
(© Ревельский И.А., Чернецова Е.С., Лузянин Б.П., Глазков И.Н., Шнайдер А.А. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73. № 7. С. 20 – 26)

Название препарата	Специфицированное содержание ДВ, мг	Допустимый разброс результатов ВЭЖХ, мг	Результат ВЭЖХ (мг)	Результат АЭА	
				$\langle x \rangle \pm \Delta x$ (мг)	$s_r$ (%)
«Зерит» образец № 1	30	—	—	$30.4 \pm 0.9$	3.2
образец № 2	30	28.50 – 31.50	29.45	$29.5 \pm 0.7$	2.6
образец № 3	40	38.00 – 42.00	39.54	$41.4 \pm 0.9$	2.3
«Капотен» образец № 1	25	—	—	$24.1 \pm 0.3$	1.3
образец № 2	25	—	—	$23.9 \pm 0.3$	1.4
образец № 3	25	23.1 – 26.9	24.6	$24.4 \pm 0.7$	3.1
образец № 4	25	—	25.8	$24.9 \pm 0.6$	2.6
образец № 5	25	23.1 – 26.9	24.4	$24.3 \pm 0.5$	2.2
«Соталекс» образец № 1	160	—	—	$160 \pm 4$	2.7
образец № 2	160	—	—	$156 \pm 2$	1.4
образец № 3	160	152 – 168	157.9	$158 \pm 3$	2.1
«Триампур комполитум»	37.5 (= 12.5 + 25)	—	—	$40 \pm 1$	2.7
«Триамтерен/ гидрохлортиазид»	62.5 (= 25 + 37.5)	—	—	$63 \pm 1$	1.7

*Определение содержания действующего вещества в жидких лекарственных формах.* Нами разработан также подход к быстрому определению содержания ДВ в жидких (ампулированных) ЛФ для парентерального введения, который также требовал соблюдения близости содержания азота в навесках, содержащих анализируемые ЛС, и в навесках вещества-стандарта, используемых для градуировки по азоту. В табл. 5 приведены результаты определения содержания действующего вещества в ряде жидких ЛФ для парентерального введения.

Согласно ГФ РФ, отклонение массы содержимого одной ампулы при массе ДВ 100 мг и менее составляет  $\pm 10\%$ , а при массе 300 мг и более –  $\pm 5\%$ . Из полученных результатов следовало, что содержание ДВ в ампулах препарата «Супрастин» и особенно препарата «Анальгин» было занижено, что может быть показателем несоответствия препаратов технологическим требованиям.

Таблица 5

Результаты определения содержания действующего вещества в жидких ЛФ для парентерального введения и некоторых таблетированных ЛФ с тем же действующим веществом ( $n = 5, P = 0.95$ )

(© Wiley: Revelsky I.A., Chernetsova E.S., Luzyanin B.P., Fedoseeva M.V., Glazkov I.N., Revelsky A.I. *Drug Test. Anal.* 2010. V. 2. № 9. P. 452 – 454)

Название препарата	Лекарственная форма	Содержание действующего вещества в ЛС		
		специфицированное (мг)	найденное АЭА	
			$\langle x \rangle \pm \Delta x$ (мг)	$s_r$ (%)
«Анальгин»	Таблетки	500	$439 \pm 3$	0.5
	Ампулы	500	$392 \pm 7$	1.4
«Димедрол»	Таблетки	50	$45 \pm 1$	1.8
	Ампулы	10	$9.5 \pm 0.3$	2.5
«Диклофенак»	Ампулы	75	$74.1 \pm 0.6$	0.7
«Ортофен»	Ампулы	75	$69 \pm 2$	2.3
«Супрастин»	Таблетки	25	$25.8 \pm 0.3$	0.9

Для всех остальных изученных жидких ЛФ найденное содержание ДВ находилось в пределах допустимого значения.

*Особенности скрининга лекарственных средств на фальсификаты методом АЭА после проведения скрининга ДАРТ-МС.* В результате исследований разработаны способы быстрого определения содержания ДВ в таких ЛФ, как таблетки, капсулы и ампулы с водными растворами. Достоинствами предложенных подходов по сравнению с существующими являются минимизированная пробоподготовка и исключение использования стандартных образцов аналитов. Это открывает новые возможности в скрининге для обнаружения фальсификатов, производственном контроле и внеплановом контроле качества фармацевтической продукции.

Ограничением предлагаемого подхода является то, что в нем ДВ должно являться единственным азотсодержащим компонентом анализируемого ЛС. В случаях, когда примесями являются изомеры ДВ, при полиморфизме лекарственных субстанций, в случаях негорючих таблетированных лекарств, при наличии азотсодержащих наполнителей (например, поливинилпирролидона) и в случаях многокомпонентных лекарств с большим разбросом в содержании различных ДВ необходимо привлечение других методов. Однако по нашим оценкам в 75% случаях таблетированных препаратов предлагаемый подход, основанный на элементном анализе, применим и обеспечивает высокую производительность анализов,

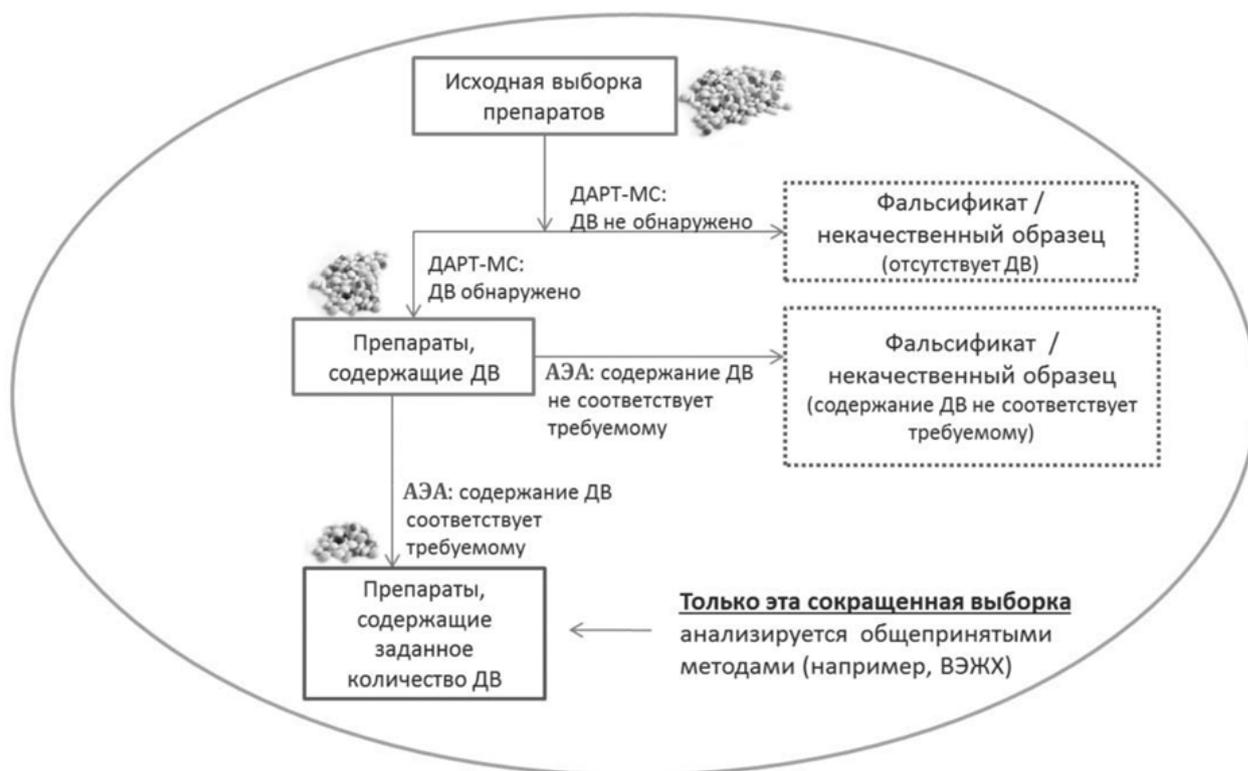
необходимую для действенного контроля качества ЛС и проведения быстрого поиска фальсификатов. Предлагаемые подходы, основанные на АЭА, дополняют ДАРТ-МС в скрининге ЛС. Если при изготовлении фальсификата была внесена азотсодержащая добавка, чтобы скрыть тем самым выявляемый методом АЭА недостаток ДВ, она будет обнаружена ДАРТ-МС. В свою очередь, метод АЭА позволяет для препаратов, в которых методом ДАРТ-МС искомый компонент обнаружен, быстро определить содержание этого компонента, тем самым сокращая выборку препаратов, в которых необходимо проверить другими методами ГФ РФ наличие и содержание ДВ на соответствие заданным. Это позволит решить задачу по быстрой сортировке исходной выборки для исключения из нее некачественных препаратов, в которых состав и содержание ДВ не соответствует заданному.

**Оценка содержания действующего вещества в лекарственных средствах с использованием спектроскопии ЯМР.** Возможность проведения стадии скрининга методом ДАРТ-МС с последующей быстрой оценкой содержания компонентов ЛС методом спектроскопии ЯМР рассмотрена на примере ЛС “Бисептол”, масс-спектр ДАРТ которого приведен на рис. 2. Качественный анализ методом ДАРТ-МС позволяет подтверждать наличие в ЛС органических вспомогательных веществ и ДВ, но совпадение их точных моноизотопных молекулярных масс с ожидаемыми не исключает возможности наличия изомерных или иных соединений с такими же массами. С помощью выбранного примера показано, что, в отличие от АЭА, при использовании ЯМР возможна не только оценка содержания аналитов в образце, но и получение структурной информации для проверки результата ДАРТ-МС и повышения достоверности предварительной идентификации компонентов ЛС методом ДАРТ-МС.

### **Методология быстрого скрининга лекарственных препаратов и субстанций, основанная на масс-спектрометрии ДАРТ**

В результате проведенного исследования для ряда ЛС российского и зарубежного изготовления впервые получены масс-спектры ДАРТ и установлено, что метод пригоден для быстрой идентификации их низкомолекулярных компонентов. Использование МС высокого разрешения обеспечивает более высокую достоверность и возможность калибровки шкалы масс-прибора с использованием

в качестве внутреннего стандарта сигналов основы, что способствует увеличению производительности анализов. Для скрининга фармацевтических субстанций и синтетических лекарственных препаратов на фальсификаты и некачественные препараты мы предлагаем методологию идентификации ЛС (рис. 3).



**Рис. 3.** Методология скрининга синтетических лекарственных препаратов и субстанций на фальсификаты и некачественные препараты

В ней мы предлагаем после первичной инспекции на предмет целостности упаковки и соответствия сопроводительным документам проводить выборочный анализ ЛС методами ДАРТ-МС для быстрого обнаружения ДВ. Один анализ длится несколько секунд, поэтому возможен контроль большого числа проб. Для некоторых из них предлагается на втором этапе использовать АЭА для скрининга ЛС на содержание ДВ. Таким способом можно однозначно выявить препараты, не содержащие ДВ, препараты, содержащие недостаточное количество ДВ, и препараты, в которых специфицированное ДВ заменено на другое, не соответствующее указанному в маркировке. Обе стадии не требуют образцов сравнения аналитов и позволят сократить выборку препаратов для последующего анализа другими методами ГФ РФ или методом ЯМР.

## **АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ОСНОВАННЫЙ НА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДАРТ**

Целью анализа ЛС природного происхождения может быть как контроль их качества, включающий идентификацию известных фармакологически активных компонентов, так и изучение состава компонентов, в том числе и не известных ранее, например, для расширения понимания причин влияния препаратов на организм и получения сведений, необходимых для сбора лекарственного сырья в условиях, наиболее благоприятных для его дальнейшего использования в медицине. Как показало исследование, анализ природных ЛС осуществлять при использовании прямого анализа образцов методом ДАРТ-МС сложнее, чем анализ синтетических ЛС, и такие объекты требуют индивидуальных подходов к их анализу. Условия и стратегия анализа зависят от состава объекта и поставленной задачи. Нами исследована возможность применения ряда подходов, основанных на ДАРТ-МС и ее сочетании с другими методами, для установления состава природных ЛС.

### **Изучение состава фармакогностических объектов животного происхождения – прополиса и мёда**

На данном этапе исследований изучали состав компонентов прополиса и мёда, используя различные подходы, основанные на ДАРТ-МС и ТСХ.

**Изучение фенольных компонентов прополиса.** Прополис («пчелиный клей») – продукт жизнедеятельности пчел, химический состав которого требует изучения. Фенольные соединения – важные компоненты прополиса, обуславливающие его лечебные свойства. Их идентификацию часто проводят методами капиллярного электрофореза, ВЭЖХ или ВЭЖХ-МС. Интерес представляют новые стратегии анализа, имеющие преимущества по сравнению с общепринятыми за счет более высокой экспрессности или предоставления новой информации о составе компонентов.

*Быстрая предварительная идентификация фенольных соединений-маркеров методом ДАРТ-МС низкого разрешения.* Установили, что возможна идентификация фенольных соединений-маркеров, компонентов фармакогностических объектов (здесь: прополиса) методом ДАРТ-МС высокого разрешения

с орбитальной ионной ловушкой в режиме регистрации отрицательных ионов, обеспечивающем снижение влияния матрицы образца и упрощение идентификации за счет селективности к донорам протона. Для установления элементных формул соединений-маркеров возможен выборочный анализ образцов методом ДАРТ-МС высокого разрешения.

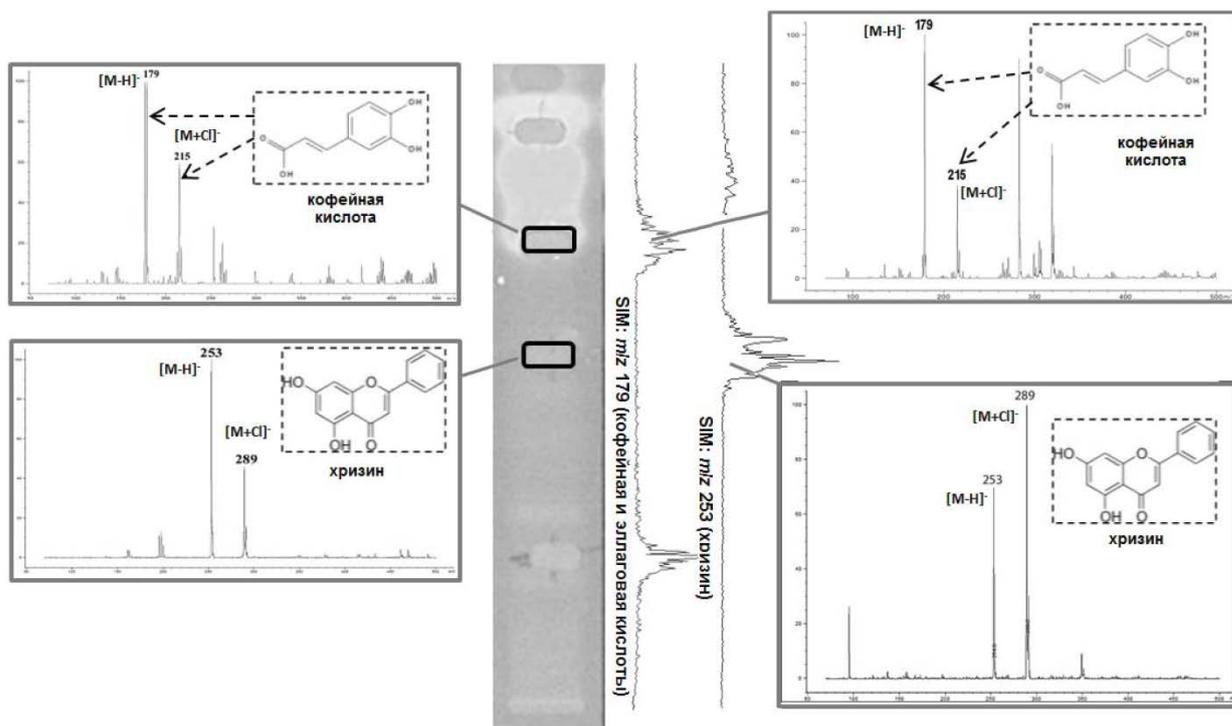
Достоинством способов анализа экстрактов прополиса, основанных на ДАРТ-МС, являлась высокая скорость накопления масс-спектров: длительность анализа одного образца составляла в среднем 30 с, включая длительность ввода одного образца и временной интервал между двумя вводами. После формирования списка потенциальных соединений-маркеров за счет анализа масс-спектров ДАРТ отрицательных ионов дополнительную проверку наличия таких соединений осуществляли путем быстрой регистрации масс-спектров ДАРТ тех же экстрактов в режиме регистрации положительных ионов.

Для образцов прополиса, отнесенных к двум различным по составу группам на основании распределения зон на ВЭТСХ-хроматограммах, методом ДАРТ-МС высокого разрешения определили возможные элементные формулы потенциальных фенольных соединений-маркеров: ванилина, бензилового, 3-метил-2-бутен-1-илового, метилового и 2-(фенил)этилового эфиров кофейной кислоты, изоликвиригенина (или ликвиригенина), изомеров метоксифлаванона, нарингенина, пинобанксина, пинобанксин-3-ацетата, пиностробина, пиноцембрина, эрманина, кофейной, кумаровой, хризина, феруловой кислот. Полученные результаты сравнивали с числом цитирований в литературе о наличии тех или иных маркеров в образцах прополиса с помощью системы научного библиографического поиска «SciFinder». Разница между экспериментальными и теоретическими значениями  $m/z$  для найденных соединений-маркеров составляла в среднем  $0.3 \times 10^{-3}$  а.е.м., что находилось в пределах допустимой погрешности. Это первое исследование о возможности использования анализа встречаемости предполагаемых соединений в литературных данных для обоснования выбора структурной формулы предполагаемого компонента из списка возможных брутто-формул, установленных из данных ДАРТ-МС высокого разрешения, для идентификации компонентов природных ЛС. Таким образом, получены новые данные о различиях в составе фенольных компонентов образцов прополиса из различных регионов.

При использовании аналогичного подхода нами также впервые проведено исследование состава компонентов экстрактов бадана методом МС высокого разрешения и получены данные о составе фенольных соединений в них (результаты рассмотрены далее). Подходы, описанные в данной работе, могут быть использованы для изучения состава фенольных компонентов любых типов фармакогностических объектов, что позволит получить новую информацию, важную для установления их свойств и применения в медицине.

*Подтверждение состава фенольных соединений методом ТСХ-МС с ионизацией ДАРТ и ИЭР.* Идентификация соединений-маркеров методом ТСХ основана на экспериментальном сравнении факторов удерживания ( $R_f$ ) идентифицируемых неизвестных компонентов смесей (например, экстрактов прополиса или растительных экстрактов) с факторами удерживания модельных растворов предполагаемых компонентов. Использование селективных способов детектирования позволяет повысить достоверность такой идентификации.

При сочетании ВЭТСХ с ионизацией ДАРТ использовали динамический режим сканирования за счет десорбции и ионизации в потоке газа-носителя из источника ДАРТ. Проводили регистрацию хроматограмм по полному ионному току, построение реконструированных хроматограмм по характеристичным ионам и идентификацию, основанную на масс-спектрах. На рис. 4 слева приведены масс-спектры ВЭТСХ-ИЭР, а справа – реконструированные по депротонированным молекулам хризина и кофейной кислоты ВЭТСХ-ДАРТ масс-хроматограммы, полученные при сканировании ВЭТСХ-пластин в режиме полного ионного тока, и соответствующие масс-спектры. Данные идентификации соединений-маркеров с пластины ТСХ, основанные на анализе масс-спектров, подтверждены при использовании ИЭР в статическом режиме при экстракции с пластины и одновременной подаче элюата в источник ИЭР того же масс-анализатора. Идентификацию аналитов проводили при сопоставлении  $R_f$  и изображений ВЭТСХ-пластин, ТСХ-хроматограмм ДАРТ и масс-спектров ДАРТ и ИЭР для компонентов экстрактов прополиса и образцов сравнения.



**Рис. 4.** Иллюстрация к эксперименту ВЭТСХ-ДАРТ-МС и ВЭТСХ-ИЭР-МС для одной хроматограммы экстракта прополиса (*материалы международного симпозиума «HPTLC 2011»*: [http://www.hptlc.com/old/pdf/2011basel/20110708\\_0925\\_Chernetsova.pdf](http://www.hptlc.com/old/pdf/2011basel/20110708_0925_Chernetsova.pdf))

Сочетание ВЭТСХ-МС позволяло воспользоваться достоинствами МС при детектировании аналитов из зон ВЭТСХ-хроматограммы в режиме сканирования. При таком сочетании возможно использование разных масс-анализаторов для получения максимально достоверной информации о составе аналитов в экстрактах.

*Классификация образцов методами хемометрики при сочетании данных ТСХ и ДАРТ-МС низкого разрешения.* Перспективным подходом к исследованию состава ЛС природного происхождения является анализ многомерных данных, поскольку в таких объектах важно не только подтверждение присутствия нескольких основных компонентов, но и идентификация характерных соединений-маркеров (примесей), определяющих качество исследуемых фармакогностических объектов.

Изучали возможность использовать для экстрактов прополиса масс-спектры ДАРТ отрицательных ионов низкого разрешения в качестве «отпечатков пальцев», характеризующих распределение фенольных соединений в образцах. Исследовали масс-спектры экстрактов 91 образца прополиса, собранных в различных регионах. Масс-спектры ДАРТ получали при усреднении сигнала экстракта по ширине пика

на хронограмме на полувысоте и анализировали для классификации образцов и определения характеристичных  $m/z$  фенольных маркеров. Результаты классификации образцов прополиса методом главных компонент по масс-спектрам ДАРТ на 87% совпадали с результатами их визуальной классификации методом ТСХ. Предварительный анализ данных ТСХ средствами хемометрики обеспечивал увеличение надежности классификации образцов по масс-спектрам ДАРТ. Используя ТСХ и различные способы дериватизации, получали информацию о функциональных группах, тогда как масс-спектры ДАРТ в режиме отрицательных ионов позволяли рассчитать предполагаемые моноизотопные молекулярные массы соединений-маркеров и получить информацию, дополняющую данные ТСХ.

Подход, основанный на сочетании данных ТСХ и ДАРТ-МС, позволил классифицировать образцы прополиса тремя разными способами и получить информацию о возможном составе функциональных групп главных соединений-маркеров, а также об их возможных моноизотопных молекулярных массах. Подходы к классификации образцов, сочетающие ДАРТ-МС и ТСХ, применимы для получения информации о составе соединений-маркеров в фармакогностических объектах, оценки их фармакологических свойств, а также для решения других задач фармацевтической химии и фармакогнозии по классификации образцов и поиску соединений-маркеров в них, в том числе при установлении биологического или географического происхождения образцов, поиске низкомолекулярных биомаркеров различных заболеваний и установлении подлинности ЛС.

**Скрининг меда на 5-гидроксиметилфурфурол.** Мед используют в качестве средства для лечения различных заболеваний как в чистом виде, так и в качестве вспомогательного вещества для получения готовых ЛС. Показателем качества пчелиного меда является содержание 5-гидроксиметилфурфурола (ГМФ). При обнаружении ГМФ на уровне  $25 \text{ мг}\cdot\text{кг}^{-1}$  и выше согласно ГОСТ 19792-2001 образец меда относят к фальсификату или меду низкого качества. Определение ГМФ в меде часто проводят методами ВЭЖХ или спектрофотометрии после обработки образца по Уинклеру или Уайту. Ограничением определения по Уинклеру является канцерогенность реагента и недостаточно высокая точность по сравнению с ВЭЖХ и определением по Уайту. Точность методики Уайта уступает ВЭЖХ при определении ГМФ в меде. Ограничением ВЭЖХ является высокая длительность

анализа, которая обычно составляет 30 минут и более. Поэтому представлялась актуальной разработка новых подходов к скринингу мёда на ГМФ.

*Оценка использования ДАРТ-МС для быстрого скрининга мёда на 5-гидроксиметилфурфурол.* Для разработки новых подходов к скринингу мёда на ГМФ использовали ДАРТ-МС и ТСХ. Определение ГМФ в мёде методом ДАРТ-МС осложнялось термическим разложением сахаров в области ионизации ДАРТ и образованием масс-спектров сложного состава. Особенности интерпретации масс-спектров при ионизации сахаросодержащих матриц следует учитывать при анализе сахаросодержащих ЛС и образцов природного происхождения методом ДАРТ-МС.

Получены первые экспериментальные подтверждения того, что возможен скрининг ГМФ в мёде методом ДАРТ-МС, позволяющий сократить выборку образцов, для которых необходим последующий анализ другими методами. Для остальных образцов возможен ВЭТСХ-анализ.

*Быстрый скрининг пчелиного мёда на 5-гидроксиметилфурфурол методом ВЭТСХ.* Новый способ быстрого обнаружения ГМФ в мёде методом ВЭТСХ, разработанный нами, позволяет отделить ГМФ от сахаров и произвести обнаружение с помощью разных способов детектирования. При быстром определении содержания ГМФ в различных образцах мёда результаты ВЭТСХ и ВЭЖХ были близки между собой, хотя ВЭТСХ-анализ в несколько раз быстрее ВЭЖХ-анализа. Для ВЭТСХ-анализа не требуется предварительной фильтрации растворов мёда и возможно одновременное хроматографирование нескольких (до 20) образцов на одной ВЭТСХ-пластине, при этом длительность одновременного хроматографирования всех этих образцов составляет 5 минут, что при пересчете на один образец превосходит по скорости анализа все общепринятые методы. Разработанный способ быстрого обнаружения ГМФ в мёде методом ВЭТСХ соответствовал требованиям к способам определения ГМФ в мёде в РФ и за рубежом. Достоинством предлагаемого подхода является снижение временных затрат и стоимости одного анализа. Благодаря тому, что в ВЭТСХ, в отличие от ВЭЖХ и ультра-ВЭЖХ, значительно меньшую проблему представляет собой загрязнение начального участка неподвижной фазы компонентами пробы, в предложенном подходе без ограничений возможно использование упрощенной пробоподготовки, включающей только растворение мёда в воде и не требующей последующей

фильтрации проб. Разработанный способ скрининга позволяет повысить скорость анализов в несколько раз в пересчете на образец по сравнению с ВЭЖХ, что важно для обеспечения эффективного контроля качества. Возможно проведение неразрушающего анализа проб на ТСХ-пластине, их хранение и повторная проверка результатов анализа через значительное время (установлена возможность анализа спустя недели) после его проведения. Это – достоинство метода ТСХ по сравнению с общепринятыми методами, которое может иметь важное значение для организации документирования и хранения результатов фармацевтических исследований и обеспечения их соответствия регламентируемым требованиям.

**Изучение состава фармакогностических объектов растительного происхождения – зеленых и ферментированных листьев бадана толстолистного**

Растения рода *Bergenia* (*Saxifragaceae*) используются в традиционной медицине России и ряда стран Азии за счет их лекарственных свойств (известны противовоспалительный, антиоксидантный, противомикробный и иммуностимулирующий эффекты). В России чаще всего используют вид *Bergenia crassifolia* L. (*Saxifraga crassifolia*) – бадан толстолистный. Представляло интерес изучение состава листьев бадана с использованием ДАРТ-МС.

*Идентификация ряда фенольных компонентов методом ДАРТ-МС высокого разрешения.* Нами впервые проведены исследования состава компонентов зеленых и ферментированных листьев бадана методом ДАРТ-МС с масс-анализатором на основе орбитальной ионной ловушки. Для анализа использовали подходы, разработанные при анализе экстрактов прополиса. Для характеристичных сигналов в масс-спектре отрицательных ионов, зарегистрированном с использованием сочетания источника ДАРТ с орбитальной ионной ловушкой, рассчитывали возможные элементные формулы. По точным  $m/z$  идентифицировали депротонированные молекулы известных из литературы соединений-маркеров бадана: галловой и эллаговой кислоты, арбутина, бергенина и гидрохинона. Также предварительно идентифицировали ряд других компонентов бадана: бергаптена, бергенина, норатириола, норбергенина, пирогаллола, тригидроксикумарина, ацетилсалициловой, малевой, фумаровой, фуранкарбоновой и хинной кислоты.

*Идентификация летучих и среднелетучих компонентов методом ДАРТ-МС высокого разрешения в сочетании с ГХ-МС.* Для идентификации летучих и среднелетучих компонентов листьев бадана привлекательным представлялось дополнить данные ДАРТ-МС данными ГХ-МС и провести благодаря этому идентификацию компонентов листьев бадана. Используя сочетание таких методов, предварительно идентифицированы 29 компонентов и установлены отличия в составе зеленых и ферментированных листьев по содержанию в них 9,12-октадекадиеновой, гексадекановой и тетрадекановой кислот, фитола, неролидола, гераниола, линалоола,  $\alpha$ -бисаболоксида В и  $\alpha$ -терпинеола. Некоторые компоненты обнаружены только в одном типе листьев: в зеленых листьях обнаружены 2,4-гептадиеналь (изомеры), декадиеналь (изомеры),  $\delta$ -кадинен,  $\alpha$ -кадинол, *E*-2-ноненаль и фарнезилацетон, а в ферментированных –  $\alpha$ -бисаболол и 9-октадеценвая кислота.

На примере решения задачи по получению новых сведений о составе листьев бадана показаны новые подходы к изучению состава компонентов растений с помощью ДАРТ-МС высокого разрешения. Эти подходы могут использоваться для изучения состава компонентов фармакогностических объектов, определяющих их качество.

### **Методология анализа лекарственных средств, основанная на масс-спектрометрии ДАРТ и ее сочетании с другими методами (ТСХ, ГХ-МС, ЯМР)**

Применение новых подходов к анализу природных ЛС, основанных на ДАРТ-МС и ТСХ, позволило разработать методологию быстрого анализа ЛС (рис. 5). Реализация различных стратегий в рамках представленной методологии в работе проиллюстрирована следующими рассмотренными нами примерами, для которых в диссертации обсуждаются особенности и ограничения каждого подхода: обнаружение ДВ в синтетических ЛС (А, Б), классификация большого числа проб прополиса по составу фенольных компонентов (А), обнаружение биологически активного вещества в сложной для анализа сахаросодержащей матрице (Б), обнаружение известных (А) и неизвестных (В) компонентов прополиса и бадана. Используя эти стратегии возможно исследовать многокомпонентные образцы и быстро проводить контроль качества благодаря одновременной регистрации десятков соединений.



**Рис. 5.** Методология анализа ЛС, основанная на ДАРТ-МС и ее сочетании с другими методами анализа (ТСХ, ГХ-МС, ЯМР)

Для ключевых компонентов возможна быстрая оценка содержания методом ВЭТСХ. Такая методология предполагает использование дополнительных способов анализа, не требующих образцов сравнения (например, ГХ-МС и ЯМР), позволяющих расширить информацию, получаемую методами ДАРТ и ТСХ. Ионизация ДАРТ обеспечивает максимально быстрое получение данных методом МС, а ВЭТСХ является экспрессным хроматографическим методом и позволяет проводить одновременное разделение большого числа проб в идентичных условиях. Гибридные подходы, включающие сочетание ВЭТСХ с разными способами детектирования, обеспечивают дополнительные возможности в классификации образцов, идентификации аналитов и количественном анализе. Использование различных способов детектирования в ТСХ расширяет возможности ДАРТ-МС и ее сочетания с ТСХ, обеспечивает получение разносторонней информации и является частью данной методологии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По полученным результатам можно сделать следующие выводы.

1. Внесен вклад в развитие научных основ ДАРТ-МС для фармацевтического анализа и создана система новых подходов, основанных на ДАРТ-МС, для изучения состава и контроля качества ЛС.

2. Обоснованы пути повышения избирательности и чувствительности детектирования компонентов ЛС методом ДАРТ-МС.
3. Путем изучения влияния различных параметров на масс-спектры ДАРТ широкого круга соединений различных химических классов, используемых в фармацевтическом анализе, выявлены критерии выбора условий для фармацевтического анализа методом ДАРТ-МС.
4. Расширены возможности ДАРТ-МС в обнаружении компонентов ЛС и разработаны новые подходы, включающие анализ образцов с твердых подложек, позволяющие оптимизировать отбор, хранение и транспортировку (био)проб, а также *online*- и *offline*-сочетания ТСХ с ДАРТ-МС. Создан первый прототип трехмерного сканера для ДАРТ, обеспечивающий размещение плоских объектов в области ионизации ДАРТ с адаптируемыми координатами.
5. Разработан быстрый и универсальный способ определения содержания ДВ в лекарственных препаратах и субстанциях при использовании АЭА как метода, комплементарного ДАРТ-МС для быстрого фармацевтического анализа.
6. Для быстрого обнаружения фальсифицированных или некачественных лекарственных препаратов и субстанций в отсутствие их образцов сравнения разработана методология, основанная на ДАРТ-МС и АЭА. Эта методология включает выборочный анализ препаратов методами ДАРТ-МС низкого и высокого разрешения для быстрого обнаружения ДВ и последующий анализ части этих препаратов методом АЭА для быстрого определения содержания ДВ.
7. На основании обобщения полученных результатов и накопленного опыта разработана методология фармацевтического анализа, основанная на ДАРТ-МС и ее сочетании с ТСХ, а также с другими методами анализа.

Рассмотрены перспективы развития ДАРТ-МС как метода исследований в фармацевтической химии и фармакогнозии. Представлены предложения по совершенствованию метода и рекомендации по использованию и развитию разработанных в данной работе методологий и подходов. В 2015 году методы ДАРТ-МС и АЭА впервые включены в Государственную фармакопею Российской

Федерации (XIII издание: ОФС.1.2.1.1.0008.15 «Масс-спектрометрия» и ОФС.1.2.1.0024.15 «Автоматический элементный анализ»), что позволит более широко использовать их для обеспечения качества ЛС и, следовательно, здоровья населения страны.

### ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

По теме работы опубликовано 33 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций.

1. Ревельский, И. А. Быстрый контроль качества фармацевтических препаратов, основанный на определении азота / И. А. Ревельский, **Е. С. Чернецова**, Б. П. Лузянин, И. Н. Глазков, А. А. Шнайдер // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – Т. 73, N 7. – С. 20–26.

2. Ревельский, И.А. Быстрый скрининг проб лекарственных средств на содержание действующего вещества / И. А. Ревельский, В. В. Косенко, **Е. С. Чернецова**, М. В. Федосеева, Л. И. Митькина, Б. П. Лузянин, А. И. Ревельский // Вестник Росздравнадзора. – 2009. – N 3. – С. 27–31.

3. **Чернецова, Е.С.** Стабильность работы тройных квадрупольных масс-спектрометров с ионизацией электрораспылением в исследованиях фармакокинетики и метаболизма лекарственных веществ / Е. С. Чернецова, А. С. Ковалева, А. Г. Корякова // Масс-спектрометрия. – 2009. – Т. 6, N 4. – С. 238–240.

4. **Чернецова, Е.С.** Сверхбыстрая идентификация низкомолекулярных компонентов лекарственных препаратов методом масс-спектрометрии DART / Е. С. Чернецова, П. О. Бочков, М. В. Овчаров, Г. В. Затонский, Р. А. Абрамович // Масс-спектрометрия. – 2010. – Т. 7, N 2. – С. 147–149.

5. **Чернецова, Е. С.** Масс-спектрометрия DART: быстрый скрининг таблетированных лекарственных препаратов на наличие действующего вещества / Е. С. Чернецова, Р. А. Абрамович // Вестник Росздравнадзора. – 2010. – N 2. – С. 51–53.

6. **Чернецова, Е. С.** Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией в исследованиях новых лекарственных веществ / Е. С. Чернецова, А. Г. Корякова // Масс-спектрометрия. – 2010. – Т. 7, N 2. – С. 101 – 112.

7. **Чернецова, Е. С.** Использование масс-спектрометрии DART для экспрессного подтверждения брутто-формул гетероциклических соединений / Е. С. Чернецова, М. В. Овчаров, Ю. Ю. Хомяков, П. О. Бочков, А. В. Варламов // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2010. – Т. 57, N 10. – С. 1963–1964.

8. **Чернецова, Е. С.** Уточнение состава ионов  $[M+18]^+$  в масс-спектрах DART полиэтиленгликоля при использовании масс-спектрометрии высокого разрешения / Е. С. Чернецова, М. В. Овчаров, Г. В. Затонский, Р. А. Абрамович, И. А. Ревельский // Масс-спектрометрия. – 2010. – Т. 7, N 4. – С. 299–302.

9. **Chernetsova, E. S.** Capabilities of direct analysis in real time mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry in the mint oil test / E. S. Chernetsova, Yu. Yu. Khomyakov, S. V. Goryainov, M. V. Ovcharov, P. O. Bochkov, G. V. Zatonsky, S. S. Zhokhov, R. A. Abramovich // Mendeleev Communications. – 2010. – V. 20, N 5. – P. 299–300.

10. **Chernetsova, E. S.** DART mass spectrometry: a fast screening of solid pharmaceuticals for the presence of an active ingredient, as an alternative for IR spectroscopy / E. S. Chernetsova, P. O. Bochkov, M. V. Ovcharov, S. S. Zhokhov, R. A. Abramovich // Drug Testing and Analysis. – 2010. – V. 2, N 6. – P. 292–294.

11. Revelsky, I. A. Organic elemental analysis: a new universal approach to authenticity/quality control of pharmaceuticals / I. A. Revelsky, E. S. Chernetsova, B. P. Luzyanin, M. V. Fedoseeva, I. N. Glazkov, A. I. Revelsky // Drug Testing and Analysis. – 2010. – V. 2, N 9. – P. 452–454.

12. **Чернецова, Е. С.** Масс-спектрометрический метод прямого анализа проб в режиме реального времени (DART) и его применение в фармацевтическом и биологическом анализе / Е. С. Чернецова, Г. Е. Морлок // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2011. – Т. 77, N 8. – С. 10–19.

13. **Чернецова, Е. С.** Масс-спектрометрия DART и ее применение в химическом анализе / Е. С. Чернецова, Г. Е. Морлок, И. А. Ревельский // Успехи химии. – 2011. – Т. 80, N 3. – С. 249–271.

14. Ревельский, И.А. Масс-спектрометрия DART: определение следов органических соединений в органических растворах / И. А. Ревельский, **Е. С. Чернецова**, А. И. Ревельский, Г. Е. Морлок // Масс-спектрометрия. – 2011. – Т. 8, N 3. – С. 235–255.
15. **Чернецова, Е. С.** Быстрый скрининг оксиметилфурфуrolа в меде методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / Е.С. Чернецова, И. А. Ревельский, Г. Е. Морлок // Аналитика и контроль. – 2011. – Т. 15, N 1. – С. 19–22.
16. **Chernetsova, E. S.** Fast quantitation of 5-hydroxymethylfurfural in honey using planar chromatography / E. S. Chernetsova, I. A. Revelsky, G. E. Morlock // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2011. – V. – 401, N 1. – P. 325–332.
17. **Chernetsova, E. S.** Some new features of Direct Analysis in Real Time mass spectrometry with desorption at an angle option / E. S. Chernetsova, A. I. Revelsky, G. E. Morlock // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2011. – V. 25, N 16. – P. 2275–2282.
18. **Chernetsova, E. S.** Ambient desorption ionization mass spectrometry (DART, DESI) and its bioanalytical applications / E. S. Chernetsova, G. E. Morlock // Bioanalytical Reviews. – 2011. – V. 3, N 1. – P. 1–9.
19. **Chernetsova, E. S.** Determination of drugs and drug-like compounds in different samples with Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry / E. S. Chernetsova, G. E. Morlock // Mass Spectrometry Reviews. – 2011. – V. 30, N 5. – P. 875–883.
20. **Чернецова, Е. С.** Масс-спектрометрия DART: быстрый анализ мягких лекарственных форм / Е. С. Чернецова, Р. А. Абрамович, И. А. Ревельский // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, N 11. – С. 49–51.
21. **Чернецова, Е. С.** Новый способ скрининга таблетированных лекарственных препаратов на фальсификаты с использованием масс-спектрометрии DART / Е. С. Чернецова, П. О. Бочков, Г. В. Затонский, Р. А. Абрамович // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, N 5. – С. 50–52.
22. **Чернецова, Е. С.** О возможностях использования ГХ-МС и масс-спектрометрии DART для обучающих практических занятий по масс-спектрометрии / Е. С. Чернецова, Ю. Ю. Хомяков, Г. В. Затонский, Р. А. Абрамович // Масс-спектрометрия. – 2011. – Т. 8, N 1. – С. 61–62.

23. **Чернецова, Е. С.** Экспресс-анализ комбикормов и пчелиного меда методом масс-спектрометрии DART / Е. С. Чернецова, А. Т. Лабыцина, М. В. Овчаров, П. О. Бочков, И. А. Ревельский // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2012. – Т. 78, N 7. – С. 23–25.

24. Morlock, G. E. Coupling of planar chromatography with direct analysis in real time mass spectrometry / G. E. Morlock, **E. S. Chernetsova** // Central European Journal of Chemistry. – 2012. – V. 10, N 3. – P. 703–710.

25. **Chernetsova, E. S.** ID-CUBE Direct Analysis in Real Time high resolution mass spectrometry and its capabilities in the identification of phenolic components from the green leaves of *Bergenia crassifolia* L. / E. S. Chernetsova, E. A. Crawford, A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, G. E. Morlock // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2012. – V. 26, N 11. – P. 1329–1337.

26. **Chernetsova, E. S.** Assessing the capabilities of Direct Analysis in Real Time mass spectrometry for 5-hydroxymethylfurfural quantitation in honey / E. S. Chernetsova, G. Morlock // International Journal of Mass Spectrometry. – 2012. – V. 314, N 4. – P. 22–32.

27. **Chernetsova, E. S.** DART-Orbitrap MS: a novel mass spectrometric approach for the identification of phenolic compounds in propolis / E. S. Chernetsova, M. Bromirski, O. Scheibner, G. Morlock // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2012. – V. 403, N 10. – P. 2859–2867.

28. **Чернецова, Е. С.** Быстрая классификация образцов прополиса путем анализа многомерных данных (масс-спектров DART) методом главных компонент в программе Excel / Е. С. Чернецова, А. Б. Старостин, Г. А. Калабин // Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16, N 2. – С. 210–217.

29. **Chernetsova, E. S.** Characterization of volatile and semi-volatile compounds in green and fermented leaves of *Bergenia crassifolia* L. by gas chromatography – mass spectrometry and ID-CUBE direct analysis in real time – high resolution mass spectrometry / E. S. Chernetsova, A. N. Shikov, E. A. Crawford, S. Grashorn, I. Laakso, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, R. Hiltunen, B. Galambosi, G. E. Morlock // European Journal of Mass Spectrometry. – 2014. – V. 20, N 2. – P. 199–205.

30. Morlock, G. E. Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and direct analysis in real time mass spectra for profiling of natural products / G. E. Morlock, P. Ristivojevic, **E. S. Chernetsova** // Journal of Chromatography A. – 2014. – V. 1324. – P. 104–112.

31. **Чернецова, Е. С.** Обобщенные критерии выбора условий анализа в масс-спектрометрии DART / Е. С. Чернецова, Г. А. Калабин // Аналитика и контроль. – 2014. – Т. 18, N. 3. – С. 251–265.

32. **Chernetsova, E. S.** Aspects of surface scanning by direct analysis in real time mass spectrometry employing plasma glow visualization / E. S. Chernetsova, G. E. Morlock // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2015. – V. 29, N 13. – P. 1242–1252.

33. Калабин, Г.А. Экспертиза качества лекарственных средств без стандартных образцов методами масс-спектрометрии и ЯМР / Г. Калабин, В. Васильев, **Е. Чернецова**, А. Прокопьев, Р. Абрамович, В. Ивлев, И. Матео / Аналитика. – 2017. – № 2. – С. 106–112.

Соискатель



Е.С. Чернецова

### Список сокращений и условных обозначений

АЭА	автоматический элементный анализ;
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография;
ВЭЖХ-МС	ВЭЖХ/масс-спектрометрия;
ВЭТСХ	высокоэффективная тонкослойная хроматография;
ВЭТСХ-МС	ВЭТСХ/масс-спектрометрия;
ВЭТСХ-МС ИЭР	ВЭТСХ-МС с ионизацией электрораспылением;
ГХ-МС	газовая хроматография/масс-спектрометрия;
ГФ	Государственная фармакопея
ДАРТ	прямой анализ в режиме реального времени;
ДАРТ-МС	масс-спектрометрия ДАРТ;
ДВ	действующее вещество;
ИК-спектроскопия	инфракрасная спектроскопия;
ИЭР	ионизация электрораспылением;
ЛС	лекарственное средство;
ЛФ	лекарственная форма;
М	молекулы (при обозначении иона);
МС	масс-спектрометрия;
МСВР	масс-спектрометрия высокого разрешения;
ГМФ	5-гидроксиметилфурфурол;
ОФС	общая фармакопейная статья;
ПЭГ	полиэтиленгликоль;
РУДН	Российский университет дружбы народов;
ТСХ	тонкослойная хроматография;
ТСХ-МС	сочетание ТСХ и МС;
ЦКП (НОЦ) РУДН	Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр) РУДН;
ЯМР	спектроскопия ядерного магнитного резонанса;
DART	direct analysis in real time, или ДАРТ;
$s_r$	относительное стандартное отклонение;
$\langle x \rangle \pm \Delta x$	среднее значение и доверительный интервал, выраженные в одинаковых единицах.